

L1 ANSWER 1 OF 1 WELLS COPYRIGHT 2005 THE THOMSON CORP on STN
AB DE 10235270 A UPAB: 20040310

JC17 Rec'd PCT/PTO 08 JUN 2005

NOVELTY - Cells (A) that secrete enantiomerically pure (R)- alpha -lipoic acid (I) into the culture medium and overexpress the lipoic acid synthase (lipA) gene, are new.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

(1) plasmid that contains the lipA gene under control of a promoter;
(2) method for preparing (A) by introducing the plasmid of (1) into a starting cell; and

(3) method for producing (I) by culturing (A).

ACTIVITY - Antidiabetic; Ophthalmological; Cardiant; Neuroprotective.

No biological data given.

MECHANISM OF ACTION - (I) Is an antioxidant, so protects against oxidative stress, while its reduced form (alpha -dihydrolipoic acid) regenerates other antioxidants (ascorbic acid or tocopherols) in the body.

USE - (I) Is an essential cofactor for some multienzyme complexes and is used in pharmaceuticals and food supplements e.g. for treatment and prevention of type II diabetes mellitus and its complications (polyneuropathy, cataract and cardiovascular disorders).

ADVANTAGE - The method provides enantiomerically pure (I), eliminating the need for resolution of the racemic synthetic compound and avoiding the side effects associated with the (S) form.



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 102 35 270 A1 2004.02.12

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 102 35 270.4

(22) Anmeldetag: 01.08.2002

(43) Offenlegungstag: 12.02.2004

(51) Int Cl.⁷: C12N 1/19

C12N 1/21, C12N 15/54, C12P 17/00

// (C12N 1/19, C12R 1:19) (C12P 17/00, C12R 1:19)

(71) Anmelder:

Consortium für elektrochemische Industrie
GmbH, 81379 München, DE

(72) Erfinder:

Daßler, Tobias, Dr. Dipl.-Bio., 81825 München, DE;
Maier, Thomas, Dr. Dipl.-Bio., 85221 Dachau, DE

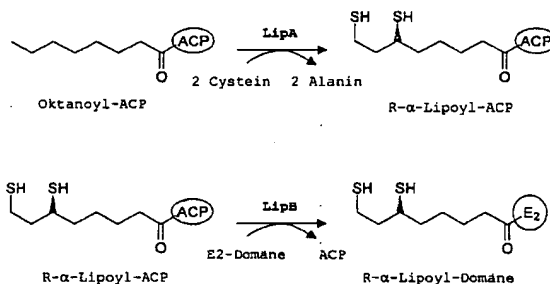
Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: Zellen, die R-alpha-Liponsäure sekretieren und Verfahren zur fermentativen Herstellung der R-alpha-Liponsäure

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Zellen und ein Verfahren zur Herstellung von R- α -Liponsäure mittels Fermentation.

Der erfindungsgemäße Wirtsorganismenstamm, der zur fermentativen Herstellung von R- α -Liponsäure geeignet ist, ist dadurch gekennzeichnet, daß er ein Gen codierend für eine Liponsäure-Synthase überexprimiert und die gebildete R- α -Liponsäure in freier Form in das Kulturmedium ausscheidet.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Zellen, die R- α -Liponsäure sekretieren und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung der R- α -Liponsäure unter Verwendung dieser Zellen.

Stand der Technik

[0002] R- α -Liponsäure ist in einer Vielzahl von Pro- und Eukaryonten ein essentieller Cofaktor bestimmter Multienzymkomplexe. Dabei ist die R- α -Liponsäure jeweils kovalent an die ϵ -Aminogruppe eines spezifischen Lysin-Rests des entsprechenden Enzyms gebunden. Auf diese Weise ist die R- α -Liponsäure ein Teil der E2-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) [EC 2.3.1.12] bzw. der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (KGDH) [EC 2.3.1.61] und spielt dort als Redoxpartner und Acylgruppenüberträger eine entscheidende Rolle bei der oxidativen Decarboxylierung von α -Ketosäuren. Außerdem fungiert Liponsäure als Aminomethyl-Carrier in Glycin-Cleavage Enzymsystemen.

[0003] α -Liponsäure ist ein optisch aktives Molekül mit einem Chiralitätszentrum am Kohlenstoffatom C6. Dabei stellt die R-Konfiguration der α -Liponsäure das natürlich vorkommende Enantiomer dar. Nur diese Form zeigt physiologische Aktivität als Cofaktor der entsprechenden Enzyme. α -Liponsäure kann sowohl in einer oxidierten (5-[1,2]-Dithiolan-3-yl-Pentansäure) als auch in einer reduzierten Form (6,8-Dimercapto-Oktansäure) vorkommen. Im Folgenden sind unter der Bezeichnung " α -Liponsäure" beide Formen sowie die jeweiligen Salze der α -Liponsäure, wie z. B. das Calcium-, Kalium-, Magnesium-, Natrium- oder das Ammoniumsalz zu verstehen.

[0004] Die Biosynthese von R- α -Liponsäure wurde besonders an dem Bakterium *Escherichia coli* intensiv untersucht (s. Fig. 1). Hier dient Oktansäure, die an das Acyl-Carrier-Protein (ACP) kovalent gebunden ist, als spezifische Vorstufe bei der Liponsäure-Synthese. In einer komplexen Reaktion werden zwei Schwefelatome auf die derart aktivierte Oktansäure (Oktanoyl-ACP) übertragen, wobei R- α -Lipoyl-ACP entsteht. Diese Reaktion wird von der Sulfurtransferase Liponsäure-Synthase [EC 2.8.1.-], dem lipA-Genprodukt, katalysiert. Als Schwefeldonor dient dabei letztendlich die Aminosäure L-Cystein. Der anschließende Transfer der R- α -Liponsäure von R- α -Lipoyl-ACP auf die E2-Untereinheit der α -Ketosäure-Dehydrogenasen wird von der Lipoyl-Protein-Ligase B [EC 6.-.-.-], dem lipB-Genprodukt, katalysiert, ohne dass dabei jedoch R- α -Lipoyl-ACP oder R- α -Liponsäure als freie Zwischenprodukte auftreten (Miller et al., 2000, *Biochemistry* 39: 15166-15178).

[0005] Über die Biosynthese von R- α -Liponsäure in Eukaryonten ist wenig bekannt. Es wird aber vermutet, dass die R- α -Liponsäure-Synthese sowie der Transfer auf die entsprechenden Enzyme in den Mitochondrien eukaryontischer Zellen auf ähnliche Weise wie in Bakterien erfolgt.

[0006] Neben ihrer Relevanz als essentieller Bestandteil von Enzymen mit einer zentralen Rolle im Stoffwechsel, wurde schon früh die Bedeutung der α -Liponsäure für die Pharmakotherapie sowie für die Nahrungsmittelergänzung (Nutraceutical) erkannt: α -Liponsäure besitzt aufgrund ihrer beiden Thiolgruppen eine ausgeprägte Wirksamkeit als Antioxidans und kann deshalb den Organismus vor schädlichen Prozessen, die durch oxidativen Stress induziert werden, schützen. Außerdem ist α -Dihydroliponsäure, die reduzierte Form der α -Liponsäure, aufgrund ihrer Eigenschaft als starkes Reduktionsmittel in der Lage, andere oxidierte natürliche Antioxidationsmittel im Körper wie Ascorbinsäure oder α -Tocopherol direkt oder indirekt zu regenerieren oder bei deren Mangel diese auch zu ersetzen. Entsprechend kommt der α -Liponsäure im Zusammenspiel mit Ascorbinsäure, α -Tocopherol und Glutathion, dem sogenannten "Netzwerk der Antioxidantien", eine zentrale Bedeutung zu. α -Liponsäure wird außerdem zur Prävention und Bekämpfung von Diabetes mellitus Typ II und dessen Folgeschäden, wie z. B. Polyneuropathie, Cataract oder Kardiovaskularleiden eingesetzt.

[0007] Die unterschiedliche biologische Aktivität beider Enantiomere der α -Liponsäure ist derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen, wobei sich allerdings immer mehr herauskristallisiert, dass die Applikation des reinen R-Enantiomers der α -Liponsäure deutliche Vorteile gegenüber der S-Form aufweist. So wurde im in vitro-Versuch gezeigt, dass nur die natürliche R- α -Liponsäure zur Bildung funktioneller α -Ketosäure-Dehydrogenasen führt. Das S-Enantiomer hatte dagegen sogar einen inhibierenden Effekt auf die Stimulierung der Enzymaktivität durch R- α -Liponsäure. Die Reduktion von α -Liponsäure und damit die Regeneration der antioxidativ wirksamen α -Dihydroliponsäure in den Mitochondrien ist für die Zelle von essentieller Bedeutung. Die mitochondriale NADH-abhängige Lipoamid-Reduktase von Säugern zeigt mit dem R-Enantiomer eine fast 20-fach höhere Aktivität als mit der S-Form. Des weiteren hat R- α -Liponsäure verglichen mit dem S-Enantiomer einen deutlich stärkeren Effekt auf die Insulin-vermittelte Glucose-Aufnahme und den Glucose-Metabolismus von Skelettmuskelzellen insulinresistenter Ratten. Im Tierversuch zeigte die R-Form außerdem einen antiphlogistischen Effekt, während die S-Form eher eine analgetische Wirkung hatte. Um unerwünschte Nebeneffekte zu vermeiden, ist es daher äußerst wünschenswert, α -Liponsäure jeweils nur in der enantiomerenreinen Form zu applizieren.

[0008] Derzeit erfolgt die großtechnische Herstellung von α -Liponsäure ausschließlich mittels chemischer Verfahren, wobei immer das Razemat aus R- und S-Form als Endprodukt gebildet wird (Y-adav et al., 1990, J.

Sci. Ind. Res. 49: 400-403). Zur Gewinnung von enantiomerenreiner R- α -Liponsäure wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Beispielsweise kann das Razemat der α -Liponsäure oder eines der Syntheseintermediate entweder chemisch mittels chiraler Hilfssubstanzen (Walton et. al, 1954, J. Amer. Chem. Soc. 76: 4748; DE 4137773) oder enzymatisch (Adger et al., 1995, J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 1563-1564) aufgespalten werden. In anderen Verfahren unterbleibt die Entstehung eines Razemats aufgrund eines enantioselektiven Syntheseschritts, wobei das neue Chiralitätszentrum entweder chemisch (DE 3629116; DE 19533881; Bringmann et al., 1999, Z. Naturforsch. 54b: 655-661; DE 10036516) oder durch eine stereospezifische Biotransformation mittels Mikroorganismen eingeführt werden kann (Gopalan und Jacobs, 1989, Tetrahedron Lett. 30: 5705-5708; Dasaradhi et al., 1990, J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 729-730; DE 10056025). Andere Prozesse wiederum starten die chemische Synthese von enantiomerenreiner α -Liponsäure mit einem natürlich vorkommenden chiralen Edukt wie z. B. S-Maleinsäure oder D-Mannitol (Brookes und Golding, 1988, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I: 9-12; Rama Rao et al., 1987, Tetrahedron Lett. 28, 2183-2186). Wegen z. T. aufwendiger Syntheseschritte, geringer Ausbeuten und hoher Materialkosten sind alle bekannten Methoden zur Herstellung von enantiomerenreiner R- α -Liponsäure derzeit nicht wirtschaftlich.

[0009] Die großtechnische Herstellung vieler niedermolekularer Naturstoffe, wie z.B. Antibiotika, Vitamine oder Aminosäuren erfolgt heute oftmals mittels eines fermentativen Verfahrens unter Verwendung verschiedener Stämme von Mikroorganismen.

Aufgabenstellung

[0010] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, Zellen zur Verfügung zu stellen, die enantiomerenreine R- α -Liponsäure in ein Kulturmedium sekretieren.

[0011] Diese Aufgabe wird gelöst durch Zellen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie ein Liponsäure-Synthase-Gen (lipA-Gen) überexprimieren.

[0012] Unter einer Überexpression ist im Sinne der vorliegenden Erfindung vorzugsweise zu verstehen, dass das Liponsäure-Synthase-Gen im Vergleich zur jeweiligen Wildtyp-Zelle, aus der das Liponsäure-Synthase-Gen gewonnen wurde, mindestens um den Faktor 2, bevorzugt mindestens um den Faktor 5 vermehrt exprimiert wird.

[0013] Vorzugsweise handelt es sich bei dem Liponsäure-Synthase-Gen um ein Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder um eine funktionelle Variante dieses Gens.

[0014] Unter einer funktionellen Variante ist im Sinne der vorliegenden Erfindung eine DNA-Sequenz zu verstehen, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz ableitet, wobei die enzymatische Aktivität der durch das Gen codierten Liponsäure-Synthase erhalten bleibt.

[0015] Um eine Überexpression des lipA-Gens in der Zelle zu erreichen, kann die Kopienzahl des lipA-Gens in einer Zelle erhöht sein und/oder es kann die Expression des lipA-Gens, vorzugsweise durch geeignete Promotoren, gesteigert sein.

[0016] Durch die Überexpression eines lipA-Gens ist die Liponsäure-Synthase-Aktivität der Zelle jeweils um mindestens den gleichen Faktor gesteigert.

[0017] Vorzugsweise überexprimiert eine erfindungsgemäße Zelle ein Liponsäure-Synthase-Gen, das für ein Protein umfassend die Sequenz ID NO: 2 oder funktionelle Varianten mit einer Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 40 %, codiert.

[0018] Vorzugsweise ist die Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 60 %, besonders bevorzugt ist die Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 80 %.

[0019] In der vorliegenden Erfindung beziehen sich alle erwähnten Homologiewerte auf Ergebnisse, die mit dem Algorithmus BESTFIT (GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GLG) Madison, Wisconsin) erhalten werden.

[0020] Die Erhöhung der Kopienzahl eines lipA-Gens in einer Zelle kann mit dem Fachmann bekannten Methoden erreicht werden. So kann zum Beispiel ein lipA-Gen in einen Plasmid-Vektor mit mehrfacher Kopienzahl pro Zelle (z.B. pUC19, pBR322, pACYC184 für Escherichia coli) kloniert und in die Zelle eingebracht werden. Alternativ kann ein lipA-Gen mehrfach ins Chromosom einer Zelle integriert werden. Als Integrationsverfahren können die bekannten Systeme mit temperenten Bakteriophagen, integrative Plasmide oder die Integration über homologe Rekombination genutzt werden (z.B. Hamilton et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 4617-4622).

[0021] Bevorzugt ist die Erhöhung der Kopienzahl durch Klonierung eines lipA-Gens in einen Plasmid-Vektor unter Kontrolle eines Promotors. Besonders bevorzugt ist die Erhöhung der Kopienzahl in Escherichia coli durch Klonierung eines lipA-Gens in ein pUC-Derivat wie z. B. pASK-IBA3 (IBA, Institut für Bioanalytik, Göttingen). Die Erfindung betrifft somit auch ein Plasmid dadurch gekennzeichnet, dass es ein lipA-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Promotors enthält.

[0022] Als Kontrollregion für die Expression eines plasmid-codierten lipA-Gens kann die natürliche Promotor- und Operatorregion des lipA-Gens dienen, die verstärkte Expression eines lipA-Gens kann jedoch insbeson-

dere auch mittels anderer Promotoren erfolgen. Entsprechende Promotorsysteme, die entweder eine andauernde oder eine kontrollierte, induzierbare Expression des Liponsäure-Synthase-Gens ermöglichen wie beispielsweise in *Escherichia coli* der konstitutive GAPDH-Promotor des gapA-Gens oder die induzierbaren lac-, tac-, trc-, lambda-, ara oder tet-Promotoren, sind dem Fachmann bekannt (Makrides S. C., 1996, Microbiol. Rev. 60: 512-538). Solche Konstrukte können in an sich bekannter Weise auf Plasmiden oder chromosomal verwendet werden.

[0023] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform für die Klonierung eines lipA-Gens wird ein Plasmid verwendet, das bereits einen Promotor zur verstärkten Expression enthält, wie beispielsweise das induzierbare tet-Promotor/Repressorsystem von *Escherichia coli*.

[0024] Des weiteren kann eine verstärkte Expression dadurch erreicht werden, daß Translationsstartsignale, wie z. B. die Ribosomenbindestelle oder das Startcodon des Gens, in optimierter Sequenz auf dem jeweiligen Konstrukt vorhanden sind, oder dass gemäß der "codon usage" seltene Codons gegen häufiger vorkommende Codons ausgetauscht werden.

[0025] Bevorzugt enthalten erfindungsgemäße Zellen ein Plasmid mit einem lipA-Gen sowie den genannten Modifikationen der Regulationssignale.

[0026] Die Klonierung eines lipA-Gens in einen Plasmid-Vektor erfolgt beispielsweise durch spezifische Amplifikation eines lipA-Gens mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion unter Einsatz von spezifischen Primern, die das komplette lipA-Gen erfassen, und anschließende Ligation mit Vektor-DNS-Fragmenten.

[0027] Erfindungsgemäße Zellen, die eine gegenüber einer Ausgangszelle erhöhte Expression eines lipA-Gens und verbunden damit eine gesteigerte Liponsäure-Synthase Aktivität aufweisen, können mit Standardtechniken der Molekularbiologie aus einer Ausgangszelle erzeugt werden.

[0028] In einer Vielzahl von Zellen konnten Liponsäure-Synthase-Gene identifiziert werden. Erfindungsgemäße Zellen lassen sich somit vorzugsweise aus Zellen von pro- oder eukaryontischen Organismen herstellen, die in der Lage sind, R- α -Liponsäure selbst zu synthetisieren (Ausgangszelle), die rekombinanten Verfahren zugänglich sind und die durch Fermentation kultivierbar sind. Auch pflanzliche oder tierische Zellen, die in Zellkultur züchtbar sind, sind somit zur Herstellung erfindungsgemäßer Zellen geeignet.

[0029] Bevorzugt handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Zellen um Mikroorganismen, wie zum Beispiel Hefe- oder Bakterienstämme. Besonders bevorzugt handelt es sich um Bakterienstämme aus der Familie der Enterobacteriaceae, ganz besonders bevorzugt um Stämme der Art *Escherichia coli*.

[0030] Durch eine gängige Transformationsmethode (z.B. Elektroporation) werden die lipA-haltigen Plasmide in eine Ausgangszelle eingebracht und beispielsweise mittels Antibiotika-Resistenz auf plasmid-tragende Klone selektiert.

[0031] Die Erfindung betrifft somit auch Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Zelle, dadurch gekennzeichnet, dass in eine Ausgangszelle ein erfindungsgemäßes Plasmid eingebracht wird.

[0032] Eine weitere Aufgabe der Erfindung war es, ein Fermentationsverfahren zur Verfügung zu stellen, welches die Herstellung enantiomerenreiner R- α -Liponsäure ermöglicht.

[0033] Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine erfindungsgemäße Zelle in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei die Zelle enantiomerenreine R- α -Liponsäure in freier Form in das Kulturmedium ausscheidet und die enantiomerenreine R- α -Liponsäure von dem Kulturmedium abgetrennt wird.

[0034] Die Gewinnung von R- α -Liponsäure aus dem Kulturmedium kann nach dem Fachmann bekannten Verfahren, wie Zentrifugation des Mediums zur Abtrennung der Zellen und durch anschließende Extraktion oder Präzipitation des Produkts erfolgen.

[0035] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um das erste Verfahren, bei dem die gesamte Synthese von R- α -Liponsäure ausschließlich in einem Fermentationsprozess mit lebenden Zellen erfolgt. Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber den herkömmlichen chemischen Prozessen liegt in der enantiomerspezifischen Biosynthese von R- α -Liponsäure, weshalb eine aufwendige Razemattrennung während oder am Ende der Synthesekette entfällt. Des weiteren ist bei dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren für R- α -Liponsäure die Umweltbelastung im Vergleich zur chemischen Syntheseweise wesentlich geringer.

[0036] Aus physiologischen und biochemischen Daten geht hervor, dass Liponsäure in Wildtyp-Zellen nahezu ausschließlich in gebundener Form vorkommt, da bereits die Synthese der R- α -Liponsäure vollständig proteingebunden erfolgt (vgl. Fig. 1) (Herbert und Guest, 1975, Arch. Microbiol. 106: 259-266; Miller et al., 2000, Biochemistry 39: 15166-15178). Überraschenderweise wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Erfindung gefunden, dass die Überexpression eines Liponsäure-Synthase-Gens zur Anhäufung freier, enantiomerenreiner R- α -Liponsäure im Kulturmedium des Wirtsorganismus führt. Dies wiederum erlaubt eine einfache Isolierung des Produkts aus dem Kulturmedium nach Abtrennung der Biomasse, ohne dass die Zellen zuvor aufgebrochen werden müssen, bzw. ohne dass die R- α -Liponsäure durch einen aufwendigen und verlustreichen Hydrolyseschritt vom daran gebundenen Trägerprotein (ACP oder die E2-Untereinheit der α -Ketosäure-Dehydrogenasen) abgespalten werden muss.

[0037] Die Kultivierung der erfindungsgemäßen Zellen zur Produktion von R- α -Liponsäure erfolgt vorzugs-

weise in einem aus der Literatur bekannten Minimalsalzmedium (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A, 269-272).

[0038] Als Kohlenstoffquelle können prinzipiell alle verwertbaren Zucker, Zuckeralkohole oder organische Säuren verwendet werden. Des weiteren können kurzkettige Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C2-C8, bevorzugt mit einer Kettenlänge von C6-C8 (Hexan- bzw. Oktansäure) als spezifische Vorstufen für die α -Liponsäure-Synthese dem Medium zugesetzt werden. Dabei beträgt die Konzentration der zugesetzten Kohlenstoffquelle vorzugsweise 1-30 g/l.

[0039] Die Inkubation der erfindungsgemäßen Zellen erfolgt vorzugsweise unter aeroben Kultivierungsbedingungen über einen Zeitraum von 16 – 150 h und im Bereich der für die jeweiligen Zellen optimalen Wachstumstemperatur.

[0040] Als optimaler Temperaturbereich werden 15 – 55 °C bevorzugt. Besonders bevorzugt ist eine Temperatur zwischen 30 und 37 °C.

[0041] Der Nachweis und die Quantifizierung der im erfindungsgemäßen Verfahren produzierten R- α -Liponsäure erfolgt beispielsweise mittels eines Bioassays unter Verwendung eines liponsäureauxotrophen Indikatorstammes (lipA-Mutante). Diese Art der turbidimetrischen Quantifizierung von R- α -Liponsäure ist aus der Literatur bekannt (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A, 269-272). Der im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendete Indikatorstamm W1485lip2 (ATCC 25645), würde allerdings auch ohne supplementierte R- α -Liponsäure wachsen, wenn das Medium neben Glucose auch noch Acetat und Succinat enthält. Um ein falschpositives Wachstum des Indikatorstammes im Bioassay bei der Bestimmung der produzierten R- α -Liponsäure zu vermeiden – beispielsweise verursacht durch einen Eintrag von Glucose und den vom Produktionsstamm zusätzlich zur R- α -Liponsäure ausgeschiedenen Säuren Acetat und Succinat – erfolgt bereits die Anzucht des R- α -Liponsäure-Produzenten bevorzugt mit Succinat als einziger Kohlenstoffquelle. Dieser Stamm wird mit dem Kulturüberstand einer erfindungsgemäßen Zellanzucht supplementiert; anhand des Wachstums des Indikatorstammes kann dann der Liponsäure-Gehalt im Kulturmedium bestimmt werden.

[0042] Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung. Der Bakterienstamm *Escherichia coli* W3110/pASK-IBA3-lipA, der für die Ausführung der Beispiele verwendet wurde, wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38142 Braunschweig) unter der Nummer DSM 15104 gemäß Budapester Vertrag, hinterlegt.

Beispiel 1: Konstruktion des Vektors pASK-IBA3-lipA

A. Amplifizierung des lipA-Gens

[0043] Das lipA-Gen aus *E. coli* wurde mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung der Pwo-DNA-Polymerase nach gängiger, dem Fachmann bekannter Praxis amplifiziert. Als Matrize diente die chromosomale DNA des *E. coli*-Wildtypstammes W3110 (ATCC 27325). Als Primer wurden die phosphorothioatgeschützten Oligonukleotide lipAS1, und lipAS2 mit folgenden Sequenzen verwendet:

lipAS1: (SEQ ID NO: 3)

5'- GAT CGA GGT CTC GAA TGA GTA AAC CCA TTG TGA TG -3'

BsaI

lipAS2: (SEQ ID NO: 4)

5'- GAT CGA GGT CTC GGC GCT CTT AAC TTC CAT CCC TTT CG -3'

BsaI

[0044] Das bei der PCR erhaltene DNA-Fragment mit einer Länge von ca. 1 kb wurde anschließend mittels eines DNA-Adsorptionssäulchens des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt.

B. Klonierung des lipA-Gens in den Vektor pASK-IBA3

[0045] In das PCR-Fragment wurden über die Primer-Sequenzen Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease BsaI (Erkennungssequenz in den Oligonukleotiden unterstrichen) eingeführt. Das gereinigte PCR-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease BsaI unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen geschnitten, anschließend über ein Agarosegel aufgetrennt und dann mittels des GENECLAN Kits (BIO 101 Inc., La Jolla, Kalifornien, USA) nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel isoliert.

- [0046] Der Klonierungs- und Expressionsvektor pASK-IBA3 (IBA, Institut für Bioanalytik, Göttingen) enthält verschiedene genetische Elemente, die eine kontrollierte Expression eines beliebigen Gens erlauben. Es handelt sich dabei um einen high-copy Vektor mit einem von der pUC-Plasmidfamilie abgeleiteten Replikationsursprung. Die Expression des klonierten Gens wird durch den Tet-Repressor unterdrückt und kann durch (Rnhydro)Tetracyclin induziert werden. Des weiteren enthält der Vektor noch die sogenannte Strep-tag II-Sequenz, welche bei der Klonierung direkt an das letzte Codon des klonierten Gens anfusioniert wird. Die auf diese Weise entstandene Genfusion codiert nun für ein Protein, das C-terminal um die Aminosäuresequenz des Strep-tag II (SAWSHPQFEK; SEQ ID NO: 5) verlängert ist. Mit Hilfe dieses Anhängsels ist eine einfache Affinitätsreinigung des Proteins möglich, da das StrepTagII-Peptid eine Bindung an Streptavidin-Säulen vermittelt.
- [0047] Zur Klonierung des lipA-Gens wurde der Vektor pASK-IBA3 mit dem Restriktionsenzym Eco31I (Iso-schizomer von BsaI) unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen geschnitten, anschließend durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase an den 5'-Enden dephosphoryliert und dann wie das PCR-Fragment mittels der GENECLAN-Methode gereinigt.
- [0048] Die Ligation des PCR-Fragments mit dem geschnittenen und dephosphorylierten Vektor erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung der T4-DNA-Ligase. Die Transformation von E. coli-Zellen des Stammes DH5a mit dem Ligationsansatz wurde mittels Elektroporation in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise durchgeführt. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Ampicillin-Agarplatten (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar, 100 mg/l Ampicillin) ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert.
- [0049] Die gewünschten Transformanten wurden nach einer Plasmidisolierung mittels eines QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) durch eine Restriktionsanalyse identifiziert.
- [0050] Im dem auf diese Weise erhaltenen Plasmid pASK-IBA3-lipA (Fig. 2) ist wie oben beschrieben an das letzte Codon des lipA-Gens die Strep-tag II-Sequenz anfusioniert. Diese C-terminale Verlängerung ist allerdings für die Erfindung nicht relevant, da sie auf die Aktivität des LipA-Proteins und damit auf die R- α -Liponsäure-Produktionsleistung des erfindungsgemäßen Wirtsorganismus keinen signifikanten Einfluss hat.

Beispiel 2: Herstellung eines Produzenten von R- α -Liponsäure

- [0051] Das in Beispiel 1 beschriebene Plasmid pASK-IBA3-lipR wurde mittels Elektroporation in den E. coli-Stamm W3110 transformiert und nach Selektion auf LB-Agarplatten mit 100 mg/l Ampicillin wurde das Plasmid aus einer der Transformanten reisoliert, mit Restriktionsendonucleasen gespalten und überprüft. Mit dem Kontrollplasmid pASK-IBA3 wurde in analoger Weise verfahren.

Beispiel 3: Fermentative Produktion von R- α -Liponsäure

- [0052] Für die fermentative Produktion von R- α -Liponsäure wurde der Stamm W3110/pASK-IBA3-lipA verwendet. Als Vergleich diente der Stamm W3110 mit dem Plasmid pASK-IBA3, der unter exakt denselben Bedingungen kultiviert wurde.
- [0053] Als Vorkultur für die Produktionsanzucht wurden zunächst 5 ml LB-Flüssigmedium, das 100 mg/l Ampicillin enthielt, mit dem jeweiligen Stamm beimpft und für 16 h bei 37 °C und 160 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und zweimal mit dem entsprechenden Volumen steriler Saline (0,9 % NaCl) gewaschen. Mit den auf diese Weise vorbereiteten Zellen wurden schließlich 15 ml BS-Medium (7 g/l K_2HPO_4 ; 3 g/l K_2HPO_4 ; 1 g/l $(NH_4)_2SO_4$; 0,1 g/l $MgSO_4 \times 7 H_2O$; 0,5 g/l $Na_3Citrat \times 3 H_2O$; 0,2% säurehydrolysiertes Casein (vitaminfrei); 13,5 g/l $Na_2Succinat \times 6 H_2O$; pH 6,8 mit HCl eingestellt), das außerdem 100 mg/l Ampicillin enthielt, im Verhältnis 1:100 angeimpft. Die Inkubation der Produktionskulturen erfolgte bei 37 °C und 160 rpm auf einem Schüttler für 48 h. Die Expression des Liponsäure-Synthase-Gens wurde durch Zugabe von 0,2 mg/l Anhydrotetracyclin nach ca. 4 h Inkubation induziert. Nach 24 h und 48 h wurden Proben entnommen und die Zellen durch Zentrifugation vom Kulturmedium abgetrennt. Die darin enthaltene R- α -Liponsäure wurde mittels des bekannten turbidimetrischen Bioassays (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A, 269-272) quantifiziert. Tabelle 1 zeigt die erzielten Gehalte freier R- α -Liponsäure im jeweiligen Kulturüberstand:

Tabelle 1

Stamm	R- α -Liponsäure [$\mu\text{g/l}$]	
	24 h	48 h
W3110 / pASK-IBA3-lipA	7,0	10,0
W3110 / pASK-IBA3	0	0

SEQUENCE LISTING

<110> Consortium fuer elektrochemische Industrie GmbH

<120> Zellen, die R-alpha-Liponsaeure sekretieren und
Verfahren zur fermentativen Herstellung der
R-alpha-Liponsaeure

<130> CO10207 / P

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 966

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(963)

<300>

<301> Reed, Kelynn E.

Cronan Jr., John E.

<302> Lipoic Acid Metabolism in Escherichia coli: Sequencing
and Functional Characterization of the lipA and lipB
Genes

<303> J. Bacteriol.

<304> 175

<305> 5

<306> 1325-1336

<307> 1993

<400> 1

atg agt aaa ccc att gtg atg gaa cgc ggt gtt aaa tac cgc gat gcc	48
Met Ser Lys Pro Ile Val Met Glu Arg Gly Val Lys Tyr Arg Asp Ala	
1 5 10 15	
gat aag atg gcc ctt atc ccg gtt aaa aac gtg gca aca gag cgc gaa	96
Asp Lys Met Ala Leu Ile Pro Val Lys Asn Val Ala Thr Glu Arg Glu	
20 25 30	
gcc ctg ctg cgc aag ccg gaa tgg atg aaa atc aag ctt cca gcg gac	144
Ala Leu Leu Arg Lys Pro Glu Trp Met Lys Ile Lys Leu Pro Ala Asp	
35 40 45	
tct aca cgt atc cag ggc atc aaa gcc gca atg cgc aaa aat ggc ctg	192
Ser Thr Arg Ile Gln Gly Ile Lys Ala Ala Met Arg Lys Asn Gly Leu	
50 55 60	
cat tct gtc tgc gag gaa gcc tcc tgc cct aac ctg gcg gaa tgc ttc	240
His Ser Val Cys Glu Glu Ala Ser Cys Pro Asn Leu Ala Glu Cys Phe	
65 70 75 80	
aac cac ggc aca gca acg ttt atg atc ctc ggc gct att tgt acc cgc	288

Asn His Gly Thr	Ala Thr	Phe Met Ile Leu Gly	Ala Ile Cys Thr Arg	
	85		90	95
cgt tgt ccg ttc tgt gat gtt gcc cac ggt cgc ccg gta gct cct gat				336
Arg Cys Pro Phe Cys Asp Val Ala His Gly Arg Pro Val Ala Pro Asp	100	105	110	
gcc aat gaa cca gtg aaa ctg gcg cag acc att gcc gat atg gcg ctg				384
Ala Asn Glu Pro Val Lys Leu Ala Gln Thr Ile Ala Asp Met Ala Leu	115	120	125	
cgt tat gtg gtt atc acc tcc gtt gac cgt gat gac ctg cgc gat ggc				432
Arg Tyr Val Val Ile Thr Ser Val Asp Arg Asp Asp Leu Arg Asp Gly	130	135	140	
ggc gcc cag cac ttt gcg gat tgc att act gcc att cgg gaa aaa agc				480
Gly Ala Gln His Phe Ala Asp Cys Ile Thr Ala Ile Arg Glu Lys Ser	145	150	155	160
ccg caa atc aaa att gaa act ctg gtg ccg gat ttc cgc ggt cgt atg				528
Pro Gln Ile Lys Ile Glu Thr Leu Val Pro Asp Phe Arg Gly Arg Met	165	170	175	
gat cgt gct ctg gat att ctg act gca acg cca cca gat gtg ttc aac				576
Asp Arg Ala Leu Asp Ile Leu Thr Ala Thr Pro Pro Asp Val Phe Asn	180	185	190	
cat aac ctg gaa aac gta ccg cgt att tac cgt cag gta cgg cct ggt				624
His Asn Leu Glu Asn Val Pro Arg Ile Tyr Arg Gln Val Arg Pro Gly	195	200	205	
gca gat tac aac tgg tgc ctg aag ctg ctg gaa cgc ttt aaa gaa gcg				672
Ala Asp Tyr Asn Trp Ser Leu Lys Leu Leu Glu Arg Phe Lys Glu Ala	210	215	220	
cat ccg gaa atc ccg acc aag tct ggt ctg atg gtg gga ctg ggt gaa				720
His Pro Glu Ile Pro Thr Lys Ser Gly Leu Met Val Gly Leu Gly Glu	225	230	235	240
acc aat gaa gaa att att gag gta atg cgc gac ctg cgc cgt cat ggt				768
Thr Asn Glu Glu Ile Ile Glu Val Met Arg Asp Leu Arg Arg His Gly	245	250	255	
gtg acg atg tta acg ctg ggg caa tat ttg cag cca agc cgc cat cac				816
Val Thr Met Leu Thr Leu Gly Gln Tyr Leu Gln Pro Ser Arg His His	260	265	270	
ctg ccg gtt caa cgt tac gtt agc ccg gat gag ttc gac gaa atg aaa				864
Leu Pro Val Gln Arg Tyr Val Ser Pro Asp Glu Phe Asp Glu Met Lys	275	280	285	
gcc gaa gcg ctg gcg atg ggc ttt acc cat gct gca tgc ggt ccg ttt				912
Ala Glu Ala Leu Ala Met Gly Phe Thr His Ala Ala Cys Gly Pro Phe	290	295	300	
gtc cgc tct tct tac cac gcc gat ttg cag gcg aaa ggg atg gaa gtt				960
Val Arg Ser Ser Tyr His Ala Asp Leu Gln Ala Lys Gly Met Glu Val	305	310	315	320
aag taa				966

Lys

<210> 2

<211> 321

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

```

Met Ser Lys Pro Ile Val Met Glu Arg Gly Val Lys Tyr Arg Asp Ala
 1           5           10           15
Asp Lys Met Ala Leu Ile Pro Val Lys Asn Val Ala Thr Glu Arg Glu
          20           25           30
Ala Leu Leu Arg Lys Pro Glu Trp Met Lys Ile Lys Leu Pro Ala Asp
          35           40           45
Ser Thr Arg Ile Gln Gly Ile Lys Ala Ala Met Arg Lys Asn Gly Leu
 50           55           60
His Ser Val Cys Glu Glu Ala Ser Cys Pro Asn Leu Ala Glu Cys Phe
 65           70           75           80
Asn His Gly Thr Ala Thr Phe Met Ile Leu Gly Ala Ile Cys Thr Arg
          85           90           95
Arg Cys Pro Phe Cys Asp Val Ala His Gly Arg Pro Val Ala Pro Asp
          100          105          110
Ala Asn Glu Pro Val Lys Leu Ala Gln Thr Ile Ala Asp Met Ala Leu
          115          120          125
Arg Tyr Val Val Ile Thr Ser Val Asp Arg Asp Asp Leu Arg Asp Gly
          130          135          140
Gly Ala Gln His Phe Ala Asp Cys Ile Thr Ala Ile Arg Glu Lys Ser
          145          150          155          160
Pro Gln Ile Lys Ile Glu Thr Leu Val Pro Asp Phe Arg Gly Arg Met
          165          170          175
Asp Arg Ala Leu Asp Ile Leu Thr Ala Thr Pro Pro Asp Val Phe Asn
          180          185          190
His Asn Leu Glu Asn Val Pro Arg Ile Tyr Arg Gln Val Arg Pro Gly
          195          200          205
Ala Asp Tyr Asn Trp Ser Leu Lys Leu Leu Glu Arg Phe Lys Glu Ala
          210          215          220
His Pro Glu Ile Pro Thr Lys Ser Gly Leu Met Val Gly Leu Gly Glu
          225          230          235          240
Thr Asn Glu Glu Ile Ile Glu Val Met Arg Asp Leu Arg Arg His Gly
          245          250          255
Val Thr Met Leu Thr Leu Gly Gln Tyr Leu Gln Pro Ser Arg His His
          260          265          270

```

Leu Pro Val Gln Arg Tyr Val Ser Pro Asp Glu Phe Asp Glu Met Lys
 275 280 285

Ala Glu Ala Leu Ala Met Gly Phe Thr His Ala Ala Cys Gly Pro Phe
 290 295 300

Val Arg Ser Ser Tyr His Ala Asp Leu Gln Ala Lys Gly Met Glu Val
 305 310 315 320

Lys

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid
 lipAS1

<400> 3

gatcgaggtc tcgaatgagt aaaccattg tgatg

35

<210> 4

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid
 lipAS2

<400> 4

gatcgaggtc tcggcgctct taacttccat ccctttcg

38

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Strep-TagII
 Sequenz

<400> 5

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 1 5 10

Patentansprüche

1. Zelle, die enantiomerenreine R- α -Liponsäure in ein Kulturmedium sekretiert, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie ein Liponsäure-Synthase-Gen (lipA-Gen) überexprimiert.
2. Zelle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie das Liponsäure-Synthase-Gen im Vergleich zu einer Wildtyp-Zelle aus der das Liponsäure-Synthase-Gen gewonnen wurde, mindestens um den Faktor 2, bevorzugt mindestens um den Faktor 5 vermehrt exprimiert.
3. Zelle nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Liponsäure-Synthase-Gen um ein Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder eine funktionelle Variante dieses Gens handelt.
4. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Kopienzahl des lipA-Gens in der Zelle erhöht ist oder die Expression des lipA-Gens, vorzugsweise durch einen geeigneten Promotor, gesteigert ist.
5. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Liponsäure-Synthase-Gen für ein Protein umfassend die Sequenz ID NO: 2 oder funktionelle Varianten mit einer Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 40 %, codiert.
6. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen Mikroorganismus, wie zum Beispiel einen Hefe- oder Bakterienstamm handelt.
7. Zelle nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen Bakterienstamm aus der Familie der Enterobacteriaceae, ganz besonders bevorzugt um einen Stamm der Art Escherichia coli handelt.
8. Plasmid dadurch gekennzeichnet, dass es ein lipA-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Promotors enthält.
9. Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Zelle, dadurch gekennzeichnet, dass in eine Ausgangszelle ein erfindungsgemäßes Plasmid eingebracht wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Ausgangszelle eine Zelle eines pro- oder eukaryontischen Organismus eingesetzt wird, die in der Lage ist, R- α -Liponsäure zu synthetisieren, die einem rekombinanten Verfahren zugänglich ist und die durch Fermentation kultivierbar ist.
11. Verfahren zur Herstellung enantiomerenreiner R- α -Liponsäure, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei die Zelle enantiomerenreine R- α -Liponsäure in freier Form in das Kulturmedium ausscheidet und die enantiomerenreine R- α -Liponsäure von dem Kulturmedium abgetrennt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Abtrennung der enantiomerenreinen R- α -Liponsäure durch Zentrifugation des Kulturmediums und anschließende Extraktion oder Präzipitation der R- α -Liponsäure erfolgt.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass eine Inkubation der Zellen in einem Minimalsalzmedium als Kulturmedium unter aeroben Kultivierungsbedingungen über einen Zeitraum von 16 – 150 h und im Bereich der für die jeweiligen Zellen optimalen Wachstumstemperatur erfolgt.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

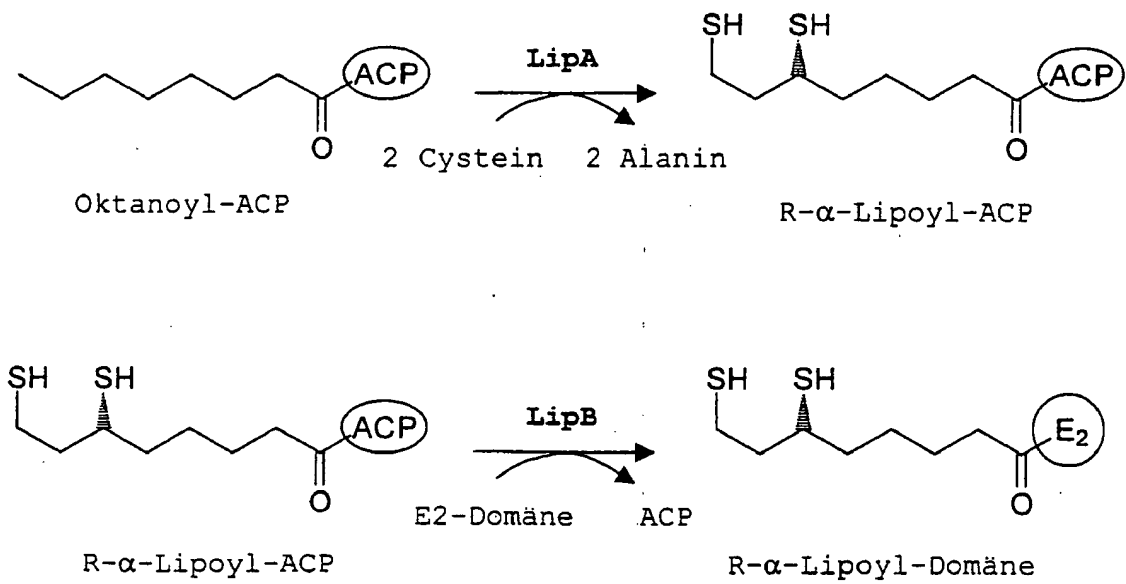
Fig. 1: Synthese der R- α -Liponsäure in *E. coli*

Fig. 2: Vektor pASK-IBA3-lipA

